



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C07K 16/18, G01N 33/53, 33/577</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/06184</p> <p>(43) 国際公開日 1997年2月20日(20.02.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/02219</p> <p>(22) 国際出願日 1996年8月7日(07.08.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/224824 1995年8月8日(08.08.95) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 栄研化学株式会社 (EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒113 東京都文京区本郷1丁目33番8号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 永徳広美(EITOKU, Hiromi)[JP/JP] 前河宏章(MAEKAWA, Hiroaki)[JP/JP] 根本二郎(NEMOTO, Jiro)[JP/JP] 和田厚文(WADA, Atsufumi)[JP/JP] 〒329-01 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社内 Tochigi, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: ANTIBODY THAT RECOGNIZES SERUM AMYLOID A</p> <p>(54)発明の名称 血清アミロイドAを認識する抗体</p> <p>(57) Abstract</p> <p>An antibody useful in the immunoassay on the basis of the agglutination of human serum amyloid A (SAA) which serves as a marker of inflammation, etc., and the use of this antibody. The antibody is a novel one which recognizes SAA and also has the activity of binding to SAA contained in the gel filtration fractions of molecular weights of 10 to 40 kD. Also, a reagent and method for the immunoassay of SAA and a method for purifying SAA by using this antibody are provided. This novel antibody having an excellent binding activity enables the assay of SAA based on the immunological agglutination thereof. This antibody is excellent in the titer against SAA and contributes not only to the specific assay of SAA at a high sensitivity but also to the widening of the assay scope.</p> <p style="text-align: right;">BEST AVAILABLE COPY</p>		

(57) 要約

本発明の課題は、炎症等のマーカーとなるヒト血清アミロイドA (SAA) の凝集反応に基づく免疫学的測定に有用な抗体と、この抗体の用途の提供である。

本発明は、ゲルろ過による分子量10-40 kDの分画に含まれるSAAに対しても結合活性を備えた新規なSAAを認識する抗体である。本発明はまた、この抗体を利用したSAAの免疫学的測定試薬、免疫学的測定方法、そしてSAAの精製方法を提供する。

本発明は、優れた結合活性を備えた新しい抗体によってSAAの免疫学的凝集反応に基づく測定を可能にした。本発明の抗体はSAAに対する力価に優れ、SAAを高い感度で特異的に測定できるのみならず、測定範囲の拡大にも貢献する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出版をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AZ	アゼルバイジャン	EE	エストニア	LR	セリビア	RO	ルーマニア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	ES	スペイン	LT	リトアニア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロバキア
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MD	モルドヴァ共和国	SN	セネガル
BY	ベラルーシ	GU	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
CA	カナダ	HE	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
CC	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	ML	マリ	TG	トーゴ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CH	スイス	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CI	コート・ジボアール	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CM	カメルーン	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CN	中国	KR	大韓民国	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CZ	チェコ共和国			NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
				NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム

明細書

血清アミロイドAを認識する抗体

技術分野

本発明は、ヒト血清中のアミロイドA（以下、SAAと省略する）を認識する

5 抗体、ならびにこの抗体の使用に関するものである。

臨床検査等の分野では、物質の測定を簡便に行うために、あるいは高い感度で特異的に測定するためにしばしば免疫学的な測定方法が利用される。抗原性物質を免疫学的な測定方法によって測定するには、抗原と特異的に反応する抗体が必要となる。つまり抗原性物質であるSAAの免疫学的な測定には、SAAを認識

10 する抗体が必要である。

SAAはある種のアミロイドーシスにおいて組織に沈着するアミロイド蛋白A（以下、AA蛋白と省略する）の前駆体蛋白とされる、分子量約12000の血清蛋白である[1]。近年になって、このSAAの血清値が炎症性疾患で上昇することが明らかにされ、鋭敏な炎症マーカーとして評価されている[2][3]。

15 背景技術

SAAを認識する抗体による免疫学的測定技術については、いくつかの報告が有る[4][5][8]。これらの先行技術文献においては、SAAを抗体と反応させることによって生じる免疫学的な凝集を指標として測定を行っている。免疫学的凝集反応を指標とする測定技術は、未結合成分の物理的な分離操作（B/F分
20 離）が不要である。そのためELISAのような不均一系の分析方法と比べて操作が簡単で自動化が容易という利点を持つ。反面、測定に利用する抗体には次のような厳しい条件が要求される。

条件A：凝集法ではより高い結合活性(avidity)が要求される。

凝集反応を起こし、しかも物理的に安定した凝集塊を維持するには一般にEL
25 ISAで要求されるよりも高い水準の結合活性が必要である。

結合活性が不十分な抗体で反応系を構成すると、たとえ抗体の使用量を増やして結合活性の低さをカバーするとしても、抗原1分子に対して結合できる抗体の数は変わらないので十分な感度を得ることはできない。またラテックスのような担体に抗体を結合して用いるときにも、やはり抗体の結合量に限界があるので、

抗体の使用量を増やすという対策では限界が有る。

条件B：ELISAでは問題とならないエピトープの位置関係が凝集法では障害となることがある。

凝集反応では、抗体が認識するエピトープが同一抗原上に複数存在していなければならない。この条件はELISAサンドイッチ法と同じである。しかし凝集法では先に述べたとおり物理的に強い結合を要求することから、たとえ物理的な位置が異なっても接近したエピトープのみで反応させることは不利である。立体障害を起こしやすく、結果として大きな凝集塊を得にくくなるためである。

- 10 ポリクローナルな抗体ではこのようなエピトープの位置関係が大きな問題となる可能性が低い。しかしポリクローナルな抗体とはいえSAAの免疫学的な測定に有用なエピトープはわずかに数個であり、モノクローナル抗体ほどではないにしろエピトープの選択は大切な条件の一つである。

先に紹介した先行技術文献に開示された技術に基づいて得られる抗体は、必ずしもこれらの条件を十分に満足するものではなかった。特に抗体の結合活性については、先の条件を満足する抗体を得ることが困難であったため、試薬の商業的な供給はむずかしいと考えられていた。

具体的には、たとえばネフエロメトリックアッセイを利用した報告[5]では、 $1 - 13 \mu\text{g/ml}$ の間で直線性を確認している。ELISAで $1.5 - 30 \mu\text{g/ml}$ [6]、あるいは $55 - 750 \text{ ng}/200 \mu\text{l}$ [7]を測定した報告が有る。

また免疫学的ラテックス凝集法による測定例[8]では、検出限界が $0.5 \mu\text{g/ml}$ であるのに対して検量線(calibration curve)は $30 \mu\text{g/ml}$ 付近で傾きを失っている。すなわちこの文献では60倍程度の濃度差しか測定できていないことになる。この値は必ずしも不十分なものではない。しかしSAAの血中濃度は大きく変動し数百 $\mu\text{g/ml}$ に達するものもあるので、多数の検体を測定する場合には測定範囲の上限を越えることも少なからず観察される。測定範囲を越える検体については、希釈・再測定が必要となるので処理能力の低下につながる。SAAでは、ドットプロットと酵素標識抗体を組み合わせた特殊な反応系で $1.25 - 160 \mu\text{g/ml}$ という測定レンジを実現した報告も有る[12]。しかしこの報告にお

いては加熱処理によって抗原性を強める処理が必要であり、本発明のように試料を前処理無しで測定する方法とは区別される。また固相イムノラジオメトリックアッセイによって、試料の変性処理を行うことなく1000倍に及ぶ測定範囲を実現した報告[13]もある。ただしこの結果はR I 標識抗体を使い固相の洗浄工程5を実施して得たものである。更に標準に利用されたS A Aの濃度が不明なので、測定範囲の評価を行うことができない。

あるいは検体の希釈率を大きくしたり、抗体の使用量を増やすことによって高値検体の測定を可能にすることもできる。しかしこのような対策では、結果として測定感度を下げることになるので実用的とは言えない。特に従来のように結合10 活性の不十分な抗体では、感度を維持しながら抗体濃度を上げることはとても困難である。つまり、幅広い濃度の試料を同じ測定条件で測定することができないのである。

本発明の課題は、S A Aの凝集反応による測定を可能とする新しい抗体の提供である。そしてこのような新規な抗体によって、優れた測定性能を持つS A Aの15 免疫学的測定試薬と、測定方法等の用途を併せて提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、正常ヒト血清をゲルろ過により分画したフラクションに対する試薬の反応性を示したグラフである。図中、縦軸はS A A測定値 ($\mu\text{g/ml}$) を、横軸は20 フラクション番号を示す。

図2は、S A A含有血清から超遠心法で精製したHDLをP B Sで希釈したもの (S A A濃度7.5 $\mu\text{g/ml}$) をゲルろ過により分画したフラクションに対する試薬の反応性を示したグラフである。図中、縦軸はS A A測定値 ($\mu\text{g/ml}$) を、横軸はフラクション番号を示す。

25 図3は、r S A AをP B Sで希釈したもの (S A A濃度7.5 $\mu\text{g/ml}$) をゲルろ過により分画したフラクションに対する試薬の反応性を示したグラフである。図中、縦軸はS A A測定値 ($\mu\text{g/ml}$) を、横軸はフラクション番号を示す。

図4は、正常ヒト血清にr S A Aを加えたもの (S A A濃度7.5 $\mu\text{g/ml}$) をゲルろ過により分画したフラクションに対する試薬の反応性を示したグラフであ

る。図中、縦軸はSAA測定値 ($\mu\text{g/ml}$) を、横軸はフラクション番号を示す。

図5は、正常ヒト血清にヒト血清から精製したSAAを加えたもの (SAA濃度 $7.5 \mu\text{g/ml}$) をゲルろ過により分画したフラクションに対する試薬の反応性を示したグラフである。図中、縦軸はSAA測定値 ($\mu\text{g/ml}$) を、横軸はフラクション番号を示す。

図6は、本発明の抗体と、従来の抗体で調製したラテックス凝集反応用試薬によって得られた検量線である。図中、縦軸は散乱光強度の差を、横軸はSAA濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を示す。

図7は、本発明の抗体のエピトープマッピングの結果である。図中、縦軸は41050nmにおける吸光度を、横軸は合成ペプチドを固定したピンの番号を示す。

図8は、従来の抗体のエピトープマッピングの結果である。図中、縦軸は450nmにおける吸光度を、横軸は合成ペプチドを固定したピンの番号を示す。

図9は、IASysによる抗体の結合活性を解析した結果である。図中、縦軸Konは解離速度定数 ($1/\text{s}$) を、横軸は抗体濃度 (nM) を示す。Ab1 (—●—) が従来の抗体、Ab2 (—○—) が本発明の抗体である。

発明の開示

本発明の課題は、次のような反応性を備えたSAAを認識する抗体によって解決される。すなわち本発明の抗体は、SAAを認識する抗体であって、高比重リポ蛋白質とSAAを含む血清を非変性条件下でゲルろ過により分画して得ることができる分子量10～40kDの分画に含まれるSAAに反応する抗体である。

以下にこの条件について具体的に説明する。

血清中ではSAAの大部分が高比重リポ蛋白質 (以下HDLと省略する) と会合した状態で存在している。HDLと会合したSAA (以下HDL-SAAと称する) は、非変性条件下でゲルろ過によって分画した時に分子量100～300kDに溶出される。通常SAAを精製する時には血清のHDL分画として回収するので、一般的な精製操作によって回収されるSAAはこの100～300kD分画に含まれるSAAとすることができる。

しかしゲルろ過により分子量を指標に分画していくと、10～40kDの分画に

もSAAがわずかに溶出する。従来の抗体ではこの分画のSAAを十分な感度で検出できないので追跡が困難であるが、本発明の抗体はこの分画に含まれるSAAと明らかに反応性を示す。なおHDL-SAAは、ゲルろ過で分子量を求めると100~300kDの分画に溶出されるので、本発明の抗体の新規な特徴は明確5 に区別することができる。

ゲルろ過による分子量10-40kDの分画に溶出されるSAAの代表的なものは、HDLと会合していないSAA（以下fSAAと省略する）である。精製fSAAを得るには、血清や腹水のようなSAAを含む原料から分子量を指標にしてfSAAを分取する方法を利用すると良い。これらの体液中でわずかに存在す10 るfSAAを回収するのである。

具体的には次のような操作を行う。たとえば血清を原料とする場合には、まずSAAを多く含む血清（ここで言うSAAはHDL-SAAも含む）の比重を調節し超遠心分離によって比重1.23~1.063の分画を回収する。回収したHDLよりも比重の大きい分画を、抗SAA抗体を使った抗体アフィニティーク15 ロマトグラフカラムにアプライし、不純物を洗浄した後にカラムに吸着したfSAAを溶出する。このときに抗体として用いるのは公知の抗体ではなく、本発明によるfSAAを認識する抗体でなければならない。従来の抗体ではfSAAを吸着することができないためである。溶出したfSAAをプールし、ゲルろ過により目的とする10-40kDの分子量を持つ分画を採取する。これを必要に応じ20 て濃縮すればfSAAを純粋な形で回収できる[9]。ただしfSAAはSAA高値血清においてもわずかしかな存在しないので、多量の原料を用意しないと十分な量を回収することはできない。たとえば100 μ g/mlのSAAを含む血清10Lを出発原料としたとき、このような精製方法では1mg程度の精製抗原を回収するにすぎない（回収率は総SAAに対して0.1%）。HDL分画から回収する25 場合には一般に10-20%程度の回収率が期待できることから、fSAAの精製が困難なことがわかる。

大量のfSAAを得るには、SAAのアミノ酸配列をコードする遺伝子をクローニングし、適当なホストベクター系に組み込んで発現させる方法を採用することもできる。本発明者等の新たに得た知見によれば、宿主に対して毒性の強

い蛋白の発現に有用な p E T 等のベクター[10]に、公知の方法[11]でクローニングした S A A のアミノ酸配列をコードする遺伝子[16]を組み込みこんで大腸菌に導入すれば、S A A のアミノ酸配列を持つ蛋白を発現可能であることを確認した。こうして発現させた S A A と同じアミノ酸配列を持つ蛋白を精製して得られる S A A (以下 r S A A と省略する) は、当然のことながら血清から精製した S A A と同じアミノ酸配列を持っているものの、その 1 分子と会合している脂質成分はきわめて少ない。このような理由から、本発明の抗体に対して血清から精製した f S A A とほぼ同じ抗原性を示すものと思われる。

なお発現系によっては、生成物の N 末端に開始コドンに対応するメチオニン残基が残ることがある。しかし本発明者らの経験によれば、S A A の場合 N 末端へのメチオニン残基の付加は抗原性や保存性に特に影響を与えなかった。したがって、N 末端へメチオニン残基を付加したペプチドは実質的に S A A と同じアミノ酸配列を持つ蛋白とすることができる。

f S A A と抗体との反応性を確認するには、f S A A をそのまま、あるいは必要に応じて担体に感作させて抗体と反応させれば良い。抗体との反応性は、寒天中での免疫沈降反応を観察するオクテロニー法、あるいは溶液中で免疫学的複合体の生成を観察する免疫学的沈降反応によっても確認することができる。反応性を数値化するためには、抗体をラテックス等の粒子担体に感作し抗原による粒子の凝集を光学的に測定する粒子凝集反応法、免疫複合体の生成を光学的に定量する免疫比濁法 (以下 T I A と省略する)、抗原を固相化して抗体の反応性を酵素標識抗体等で追跡する R I A 法や E L I S A 法を採用することもできる。

反応性の確認には、この他にウエスタンブロッティング法が有効である。つまり、H D L - S A A と f S A A が混在した状態の抗原混合物を分子量マーカールとともに Ornstein、Davis の非変性条件下での電気泳動[14][15]により分離後、これをニトロセルロース膜にブロッティングする。こうして血清蛋白を固定したニトロセルロース膜に反応性をチェックすべき抗体を接触させ、必要に応じて洗浄した後、更に抗体に対する標識抗体を反応させる。標識抗体の結合を肉眼的に判定しても良いし、あるいは発色強度 (酵素標識) やオートラジオグラフィ (R I 標識) の信号強度をデンストメーターで測定すれば定量的に反応性の比較を行

うことができる。この方法によれば、HDL-SAAとfSAAの両方に対する反応性を同時に確認することができるので便利である。

抗体の反応性を正確に比較するには、できるだけ免疫反応に好ましい条件を与えるようにする。反応性を左右する条件には、温度、pH、そして塩濃度等を示すことができる。もっとも本発明の抗体は、基本的にfSAAとの反応性を備えていることが重要なのであり、必ずしもその反応性の強さを厳密に比較しなくとも良い。これまでに知られているSAAを認識する抗体はfSAAとは実質的に反応しないので、反応性の有無を確認することで、公知の抗体と明確に識別することが可能である。

- 10 上記のような反応性を持つ抗体は、凝集活性にすぐれ、SAAの免疫学的測定方法、特に免疫学的粒子凝集反応や免疫比濁反応のための抗体として有用である。

本発明において、抗体が特定の分子量分画のSAAと実質的に反応しないとは、たとえば次のような条件のもとで抗体を反応させたときに観測可能な変化を
15 もたらさないことで定義することができる。

すなわち、SAAを含まない正常ヒト血清に一定量のSAAを添加して試料とする。実施例においてはrSAAを添加して最終的なSAA濃度を7.5 $\mu\text{g/ml}$ とした。本発明による抗体は、10 $\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは7.5 $\mu\text{g/ml}$ のSAAを添加した時に分子量10-40 kDの分画に溶出されるSAAとの反応性を確認
20 することができる。このようにrSAAをHDLを含む正常ヒト血清に混合することにより、HDLと会合したSAAとfSAAが生じる。この試料をあらかじめ分子量マーカーによって溶出パターンを確認したゲルカラムにアプライする。ゲルろ過を行って目的とする分子量分画（つまり100-300 kDと10-40 kD）を分取し、反応性を確認すべき抗体を反応させる。抗体はラテックス粒子
25 に感作し、免疫学的な凝集反応を光学測定により追跡する。このような条件で分析したとき、実質的に抗体が反応しなければ凝集反応による光学的な変化量は検出限界に満たない。なお一連の操作の詳細は実施例に述べる。

なお実施例に示すように、本発明の抗体はrSAAのPBS溶液をゲルろ過で分画したものを試料とした時にも10-40 kDの分画で反応性を示す。この分画

は r S A A そのものに他ならない。すなわち本発明の抗体は、ラテックス粒子に結合させて r S A A と反応させた時、明瞭な凝集活性を示すことにより公知の抗体と識別することもできる。

本発明による抗体の結合活性は、分子間の結合状態を定量的にとらえる分析手法
5 法によって数値化することもできる。たとえば IAsys (Affinity SENSORS) と呼ばれる市販の光バイオセンサーは、検体を入れたセンサーキューベットに様々な角度からレーザー光を当てエバネッセント波を共鳴させる入射角をもとにして、キューベットに結合した分子の質量を算出する分析システムで、キューベット中での分子間の結合および解離をリアルタイムで観察することが可能である。この分析
10 システムのキューベットに、ゲルろ過による分子量 10 - 40 kD の分画に含まれる S A A、あるいは配列 1 に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子から微生物細胞を宿主として発現させて得られる組み換えタンパク質 (r S A A) を固定した後、抗 S A A 抗体を反応させ解離平衡定数 (M)、あるいは会合平衡定数 (M^{-1}) として数値化すれば良い。好ましい態様における本発明の抗体の結合活性を解離平
15 衡定数で定義すれば、r S A A を抗原として測定した時に $2 \times 10^{-7} M$ 以下、より好ましくはおよそ $5 \times 10^{-8} M$ の値を示す。なお同じ条件で公知の抗体を分析すると、その数値はせいぜい $5 \times 10^{-7} M$ 程度となり、本発明による抗体の結合活性の優れていることが明らかである。

20 本発明の抗体は、高度に精製した f S A A を免疫原に利用し更に免疫原性を高めるための特殊な免疫方法を採用することによって安定して得ることが可能である。

免疫原に利用する f S A A は、先に説明したような方法によって得ることができる。すなわち、血清中に存在する f S A A、あるいは r S A A を免疫原とし、
25 更に抗体のスクリーニングにもこれらの抗原を利用して前記条件を満足する抗体をプールすることにより本発明の抗体を得ることができる。

また精製 f S A A や r S A A を免疫原とするときに、その抗原性を高めるために様々な技術を応用することができる。フロイントのコンプリート・アジュバント (以下、F C A と省略する) は免疫原性を高めるために必要な成分の一つであ

る。このほかヒト型結核菌を追加して免疫原とする、あるいは百日咳ワクチンを免疫時に筋注する方法を組み合わせるのが有効である。SAAは多くのほ乳動物の間で相同性が高いため、免疫動物に対して抗原性を示しにくいことが指摘されている。これまでに報告された凝集反応によるSAAの測定範囲が必ずしも十分
5 でなかったことの原因の一つは、このSAAの抗原性の低さが原因の一つであると推測される。本発明では免疫原にf SAAを用い、反応性をf SAAでスクリーニングすることによって、従来にない結合活性を備えた抗体を得、結果として強力な凝集活性を持つ抗体の提供を可能とした。

10 発明を実施するための最良の形態

こうして得られた本発明の抗体は、先に述べたような条件、すなわちゲルろ過による分子量10-40 kDに溶出されるSAAとの反応性を備えるとともに、好ましくは次のような凝集活性を持つ。すなわち本発明における好ましい抗体は、以下のような条件のもとで反応直後から300秒間の吸光度の変化量を測定した
15 ときに、盲検との差が0.05以上の値を示す。従来の抗体の持つ凝集活性では、このような大きな値を得ることはできない。

条件：

抗体を粒径0.04~0.6 μm の重合体粒子に感作

粒子濃度0.02~0.5%

20 1. 0 $\mu\text{g/ml}$ のヒト精製SAAと接触させる

液量比が検体：ラテックス乳液=1：3から1：15

なおこの反応条件は最低限必要な条件であって、この他の反応条件は対象となる抗体の特性や利用する重合体粒子等の他の成分に応じて好ましい条件を選択する
25 ることは言うまでもない。この他の反応条件とは、反応温度、測定波長、反応液のpHや緩衝剤成分をさす。

本発明は、前記抗体を利用したSAAの免疫学的測定試薬を合わせて提供する。本発明の抗体は、公知の免疫学的測定試薬に適用することができる。好ましい試薬形態として、次のようなものを示すことができる。

本発明による免疫学的測定用試薬としてもっとも好ましいのは、不溶性担体粒子に抗体を感作した免疫学的測定用試薬である。不溶性担体粒子には、ポリスチレンやゼラチンに代表される重合体粒子の他、シリカや各種金属ゾルのような無機材料、赤血球や細菌菌体のような生物学的な素材が知られている。抗体は、こ
5 れらの不溶性担体に、物理的に吸着させるか、あるいは化学的に結合することができる。

抗体を結合した不溶性担体粒子はSAAの存在下で凝集するので、この凝集を光学的に追跡するか、あるいは目視によって判定することによってSAAの測定が可能である。粒子凝集の光学的な測定には、吸光度測定や散乱光測定が知られ
10 ている。光学測定に用いられる光源は、主に不溶性担体粒子の粒径に応じて赤外部、近赤外部、そして可視部から波長が選択される。光源にはレーザーが採用される場合もある。

本発明による免疫学的測定用試薬としては、抗体が遊離の状態で存在し、かつ免疫学的な反応の場に免疫複合体形成に基づく不溶性沈降物の生成を促進する反
15 応増強剤を供給する試薬と組み合わされている形態も採用することもできる。この形態では、光学的に追跡可能な形で免疫複合体を生成しなければならないので、強い凝集活性を備えた本発明の抗体の使用が非常に有利である。

本発明の試薬において、免疫複合体形成に基づく不溶性沈降物の生成を促進する反応増強剤としては、ポリエチレングリコールやその誘導体、ノニオン系の界面活性剤、およびデキストラン硫酸等のポリアニオンが知られている。これらの
20 増強剤は、適宜組み合わせて利用すると良い。

本発明の抗体を免疫学的な測定用試薬とするときには、リウマチ因子や補体による非特異的な影響を抑制することを目的として適当な酵素で消化した断片として用いることもできる。抗体断片としては、ペプシンによるF(a b')₂、ブ
25 ラスミンによるF a c b' 等が知られている。

本発明のSAAの免疫学的測定試薬には、この他に公知の成分を組合せることができる。すなわち、免疫反応に必要なpHを与える緩衝剤、免疫反応を促進する反応増強剤、非特異反応を抑制する反応安定剤やブロッカー等を組合せても良い。

緩衝剤としては、次のようなものが利用されている。

GOOD緩衝剤

2-モルホリノエタンスルホン酸 (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid、MESと省略する)

5 ピペラジーン-ビス (2-エタンスルホン酸)

(Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)、PIPESと省略する)

(2-アセトアミド) - 2-アミノエタンスルホン酸

(N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid、ACESと省略する)

ビス (2-ヒドロキシエチル) - 2-アミノエタンスルホン酸

10 (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid、BESと省略する)

ビス (2-ヒドロキシエチル) イミノトリス (ヒドロキシメチル) メタン

(Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane、Bis-Trisと省略する)

3- [ビス (2-ヒドロキシエチル) アミノ] - 2-ヒドロキシプロパンスル

15 ホン酸 (3-[N,N-Bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid、

DIPSOと省略する)

2-ヒドロキシエチルピペラジーン-3-プロパンスルホン酸

(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-3-propanesulfonic acid、EPPSと省略する)

20 ヒドロキシエチルピペラジーン-2-エタンスルホン酸

(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid、HEPESと省略する)

2-ヒドロキシエチルピペラジーン-2-ヒドロキシプロパン-3-スルホン酸

(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-hydroxypropane-3-sulfonic acid、HEP

25 PSOと省略する)

3- (モルホリノ) プロパンスルホン酸 (3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid、MOPSと省略する)

3- (モルホリノ) - 2-ヒドロキシプロパンスルホン酸

(3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropanesulfonic acid、MOPSOと省略する)

る)

ピペラジーン-ビス (2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)

(Piperazine-N,N'-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid)、POPSOと省略す

る)

5 N-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid、TAPSOと省略する)

トリス (ヒドロキシメチル) メチル-2-ヒドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸 (N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-hydroxy-3-aminopropanesulfonic acid、TAPSOと省略する)

10 トリス (ヒドロキシメチル) メチル-2-アミノメタンスルホン酸

(N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid、TESと省略する)

その他の緩衝剤

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール

15 (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol)、またはトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) と呼ばれる

リン酸緩衝液

アンモニウム緩衝液

これらの緩衝剤の中でも、HEPESやPIPES等のGOOD緩衝剤は、免疫反応に有利なpHを与えるのみならず、蛋白質への影響が小さいので特に好ましい緩衝剤として挙げられる。

更に反応安定剤やブロッカーとしては、BSA (ウシ血清アルブミン)、動物血清、IgG、IgG断片 (FabやFc)、アルブミン、乳蛋白、アミノ酸、ポリアミノ酸、コリン、ショ糖等の多糖類、ゼラチン、ゼラチン分解物、カゼ

25 イン、グリセリン等の多価アルコール等が免疫反応において反応の安定化や非特異反応の抑止に有効なことが知られている。

これらの各種成分を含む本発明によるSAAの免疫学的測定試薬は、溶液状態で、あるいは乾燥状態で供給することができる。溶液状態で流通させるには、蛋白の安定性を高めることを目的として、更に各種界面活性剤、糖、不活性蛋白等

を加えても良い。これらの安定化剤は、試薬を乾燥するときにも安定剤として、あるいは賦形剤として有効である。本発明によるSAAの免疫学的測定試薬を溶液状態のままで流通させる場合には、SAAとの免疫学的な反応に影響を与えにくい防腐剤を添加しておくことが有利である。このような防腐剤には、アンホテリシンBやマイクロシドのような抗菌剤が用いられる。

本発明によるSAAの免疫学的測定方法は、先に述べたSAAの免疫学的測定試薬により実現する。試薬が凝集反応用のものであれば、凝集反応の進行を光学的に、もしくは肉眼によって追跡する事によって行う事ができる。

更に本発明は、以下の特徴を持つ新規なSAAの測定方法を合わせて提供する。すなわち、抗体によってヒト血清アミロイドAを免疫学的に測定する方法であって、前記抗体が不溶性担体粒子に結合されており、この不溶性担体粒子の免疫学的凝集反応の測定値が、100倍の濃度範囲においてヒト血清アミロイドAの濃度値と1:1に対応しているヒト血清アミロイドAの測定方法である。先に述べたラテックス凝集反応によってSAAを測定する場合、SAA濃度50 μ g/mlを持つ試料に対してそれを100倍まで段階希釈した試料を同じ測定条件で測定し、得られた結果をグラフにプロットする。こうして描いたグラフが検量線である。同じ測定条件とは、試料の希釈条件や試薬と試料の液量比等の測定結果に影響する条件を統一することを意味する。測定範囲の狭い公知の測定技術であっても、濃度に応じて希釈倍率や試料と試薬の液量比を変えれば100倍の濃度範囲を測定することはできる。しかし濃度に応じて測定条件を変えることは同一の測定条件という本発明の要件を満足しないから、公知の測定技術と本発明の測定技術とは明瞭に区別される。

ここでいう同じ条件とは、ある100倍の濃度範囲の測定のための条件が同じことを意味している。したがって必ずしも常に同じ測定条件を利用する必要はない。具体的には0.5-50 μ g/mlという濃度範囲(100倍)の中では同じ条件を用いるが、その測定条件と10-1000 μ g/mlという濃度範囲(100倍)を測定する時の条件とを同一にする必要はないのである。10-1000 μ g/mlを測定するには、この濃度範囲に応じた条件とすれば良い。言い換えれば、ある一定の測定条件のもとで、100倍の濃度範囲を測定できることが本発明の

特徴である。前記測定方法では、100倍という濃度範囲において対応する測定値は濃度に応じて増加し続ける。あるいは測定値が濃度に応じて下がる測定系であれば、この濃度範囲において測定値が下がり続ける。言い換えれば、本発明による新規な試薬によって描かれる標準曲線は、好ましい態様では100倍という
5 濃度範囲における測定値が一定の方向に変化し続けると定義することができる。

従来の免疫学的ラテックス凝集反応法では試薬として利用した抗体の結合活性が不十分なため、100倍という幅広い濃度範囲を同じ測定条件のもとで測定すると直線的に検量線が推移するのはその一部分のみであった。つまり低濃度域で直線性を示すものであれば濃度の上昇にともなって検量線が下がるポイントが現
10 れる。この現象はプロゾーンと呼ばれ、高濃度域での定量的な測定を困難にするものである。一方、逆に高濃度域で直線性を示す場合には、ある濃度で検量線の傾きが無くなり、測定が不可能になってしまうポイントが現れる。つまり感度が不足するのである。プロゾーン現象や感度不足状態のようにラテックス凝集反応の測定値に測定対象成分の濃度変化が反映されていない状態は、1つの測定値に
15 対して複数の濃度が対応しており、本発明において定義した両者の対応が1:1という条件を満たさない。

この他本発明は、新規な抗体を利用したSAAの精製方法を提供する。本発明の抗体はSAAに対する結合活性が強いので、抗体アフィニティクロマトグラフ法に応用した場合に高い収率でSAAを回収することができる。すなわち、SA
20 Aを含む材料をそのまま、あるいはイオン交換クロマトグラフィーや超遠心分離等で前処理した後に本発明の抗体を固定したカラムにアプライし、免疫反応によってSAAを捕捉する。SAAを捕捉したカラムを免疫学的な結合に影響しない適当な緩衝剤で洗浄後、免疫学的な結合を開裂する溶出剤でSAAを抗体から
はずして回収すれば、SAAを高い収率で得ることができる。溶出剤には1M以
25 上の高い濃度の尿素やグアニジン等のカオトロピック剤が利用される。抗体アフィニティクロマトグラフ法は適当な界面活性剤の存在下で行っても良い。

また本発明の抗体はHDL分画以外に含まれるSAAとも反応性を持つので、あらかじめ分子量や比重に基づいて分画した材料に適用したときには、fSAAの回収を可能とする。本発明の抗体によって精製されるSAAは免疫原や免疫測

定用の標準として有用である。

更に、先に述べた r S A A の回収に当たっても本発明の抗体は高い結合活性を持つので有用である。ゲルろ過による分子量 10 - 40 kD に含まれる S A A との反応性を備えた本発明の抗体によれば、r S A A の回収を容易に行うことができるのである。

本発明は、特定の結合活性を持つ新規な抗体を提供する。本発明の抗体は凝集活性に優れ、S A A の免疫学的な凝集反応に基づく試薬の測定範囲を拡大する。公知の S A A に対する抗体は、血清の H D L 分画として回収した S A A を免疫原としているので、f S A A に対しては実質的な反応性を持つ抗体が得られなかったものと推測される。一方本発明では、あえて少量しか得ることのできない f S A A や、あるいは新たに得られた r S A A を免疫原とする事によって新しい抗体を得た。

本発明の抗体は、単に f S A A と反応するのみならず、H D L - S A A に対しても従来の抗体を上回る結合活性を示す。本発明の抗体は、このような結合活性を備えることによって免疫学的測定用試薬の性能を著しく改善する。具体的には、試薬の感度を犠牲にすること無く広い範囲にわたって信頼性の高い測定を実現する。従来の抗体との f S A A に対する結合活性の違いがなぜ試薬性能の改善につながるのか、その作用機序は明らかではない。しかし実験的には、単に f S A A と反応することだけでは説明することのできない明らかな効果が確認されている。なお生体内では S A A の大部分が H D L と会合した状態で存在しており、通常の生体試料中には f S A A はほとんど観察されない。したがって本発明による抗体の f S A A に対する高い結合活性が誤った分析結果につながる恐れはない。また、炎症症状のマーカーとなるのはヒトでは S A A のサブタイプのうち 1 α 、1 β 、1 γ 、2 α 、および 2 β 等であるが、本発明の抗体はこれらのサブタイプのいずれとも反応し、しかも炎症症状との関連を示さないサブタイプ S A A - 4 に対しては反応性を持たない。

実施例

1. S A A 発現株の樹立

1-1. PCR用プライマーの合成

SAAをコードする遺伝子をPCR増幅するために、次の配列を持つプライマーを固相ホスファイト法で合成した。なおベクターのクローニングサイトに合わせてプライマーの5'側にはNdeIサイトを、同じく3'側にはBamHIサイトを導入してあり、それぞれの認識配列を[]で囲んだ。

5'側プライマー:

5' -GTAGTTCAGGT[CATATG]CGAAGCTTCTTTTCGTTCTTG-3'

3'側プライマー:

5' -GACA[GGATCC]GAGGAAGCTCAGTATTTCTCAG-3'

10 1-2. PCR増幅

SAAをコードするcDNAを増幅するために、1-1に示したプライマーと、ヒト肝組織のcDNAライブラリーのテンプレートとを用いて、94℃1分、63℃1分、72℃1分のサイクルで30サイクルPCR増幅した。増幅されたDNA断片は、2%アガロースゲル電気泳動によりおよそ350bpであることが確認され、さらに各制限酵素によるマッピングを試みたところ、公知のヒトSAAをコードするDNA配列[16]と一致することが確認された。

1-3. ヒトSAA蛋白発現ベクターの構築

1-2で増幅したDNA断片をNdeI、BamHI（宝酒造製）で消化後、アンピシリン耐性遺伝子を有するプラスミドベクターpET21-a（+）のNdeI/BamHIサイトに連結した。

1-4. 発現株の樹立

得られたプラスミドベクターを、塩化ルビジウム法によりコンピテント化した大腸菌BL21(DE3) pLysSに導入し形質転換させた。アンピシリン(125 µg/ml)を含むLB寒天培地に培養することにより形質転換された菌を選択後、プラスミドを精製しpET21よりも高分子量のプラスミドを持つ菌株を選別し、さらに抗SAA抗体と反応する分子量12000の蛋白を発現する株を選択した。発現蛋白のアミノ酸配列を調べ、配列1に示す公知のSAA1-αのN末端に開始コドン由来のメチオニンが1残基付加された配列を持つことを確認した。なお本明細書においては次のようなアミノ酸の略号を利用する。

	アラニン	A or Ala
	アルギニン	R or Arg
	アスパラギン	N or Asn
	アスパラギン酸	D or Asp
5	システイン	C or Cys
	グルタミン	Q or Gln
	グルタミン酸	E or Glu
	グリシン	G or Gly
	ヒスチジン	H or His
10	イソロイシン	I or Ile
	ロイシン	L or Leu
	リジン	K or Lys
	メチオニン	M or Met
	フェニルアラニン	F or Phe
15	プロリン	P or Pro
	セリン	S or Ser
	トレオニン	T or Thr
	トリプトファン	W or Trp
	チロシン	Y or Tyr
20	バリン	V or Val

ここで用いた p E T 2 1 は T 7 ファージプロモーターを含む形質転換用ベクターで、宿主大腸菌により供給される T 7 RNA ポリメラーゼにより組み込んだ遺伝子の転写が開始される。T 7 RNA ポリメラーゼ遺伝子は、Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を培養液に添加することで初めて誘導

25 されるので、遺伝子の転写を IPTG により制御することができる。SAA のように難溶性の物質の発現は宿主に対して毒性を示すため一般的には十分な発現量を期待できないが、このように遺伝子の転写をコントロールすれば菌体量が十分に増えた段階で発現を誘導できるので結果として発現産物の収量は増加する。

1-5. rSAA の発現

1-4で得た大腸菌PET-SAA1-BL21株をカルベニシリン (500 $\mu\text{g/ml}$) を含む300mlのLB培地に接種し37℃で培養した。600nmにおける吸光度が0.6~0.9の時点で、1mMとなるようにIPTGを加え、さらに30分後に200 $\mu\text{g/ml}$ になるようにリファンピシンを加え、3時間から6時間5培養後、遠心により沈殿物として回収した。リファンピシン添加により、発現SAAが宿主に及ぼす溶菌作用を押さえることができ、リファンピシン無添加に比べ回収量を著しく増大している。

1-6. 精製

沈殿物をグアニジン緩衝液 (4M塩酸グアニジン、0.025Mトリス-塩酸、10 pH8.6) に分散後超音波処理により菌体の破碎とrSAAの可溶化を行った。可溶化したサンプルはアフィニティーバッファー (0.5M NaCl、2mM EDTA、0.01M トリス塩酸・pH8.2、0.1% Tween20) に透析し、遠心分離により上清を分取後、抗SAA抗体を吸着させたセファロー ス4Bアフィニティーカラムに通し吸着後、溶出緩衝液 (0.5M NaCl、15 2mM EDTA、0.01M トリス塩酸・pH8.2、0.1% Tween20、3M KSCN) で溶出させ、溶出分画をグアニジン緩衝液で透析後 Sephacryl S-300カラムにアプライし分子量の違いで分離した。

分離した分画についてディスク電気泳動を行ったところほぼ純粋な状態で分離されていることが確認された。最終的に、300mlの培養物からおよそ2mgの r20 SAAを回収した。

2. 抗体

1で得たrSAAを0.01Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.6、0.05%Tween20含有) で1mg/mlに調整後、ヒト型結核死菌を加えたFCA (1mlのFCAに対して結核死菌を4mg) と等量混合し、じゅうぶんに乳化させた後に125 mlを家兎の四肢に免疫した。同時に百日咳ワクチンを後足基部に筋注した。免疫は2週間ごとに行った。4ヶ月後に一部採血して得られる抗血清について、rSAAに対する反応性をオクテロニー法によって確認した。高い抗体価が確認された個体の抗血清を40%硫酸分画してIgGを回収し、PBSに対して透析し本発明による抗SAA抗体 (10ng/ml) を得た。

3. 抗体による試薬の調製

2で得た抗SAA抗体(10mg/ml)をポリスチレンラテックス(平均粒径0.109 μ m)に37℃で1時間物理吸着させた後、0.1MのHEPES緩衝液で洗浄し、最終的にラテックス濃度0.4%となるように分散媒(1%BSAを含む0.1MのHEPES緩衝液、pH7.4)に懸濁させてSAAラテックス凝集反応用試薬(以下単に乳液と呼ぶ)を得た。

比較のため、HDL分画から公知の方法により精製したSAAで免疫して得られた従来の抗SAA抗体[17]についても同じ操作によって試薬(乳液B)を調製した。

10 4. 抗体の反応性(結合活性)

3で得た乳液を用い、抗体の結合活性をラテックス凝集反応によって比較した。操作は次のとおりである。

試料50 μ lに試薬を300 μ l加えて37℃で約3分間反応させた。この間の免疫学的凝集反応に基づく585nmにおける吸光度変化量を測定した。公知の方法[18]によって設定した標準に基づいて作成した検量線をもとにSAA濃度を決定した。試料としては、いくつかのSAA含有試料を希釈してゲルろ過法で分画したものを用いた。各分画の分子量は、あらかじめ分子量マーカーを同じ条件で溶出することにより検量線を作成し求めておいた。用意したSAA含有試料は、次の5種類である。血清から精製したSAAは、公知の方法[17]により得たものを20用いた。また精製HDLと混合したものは、混合後4℃で一晩放置してから実験に用いた。

- (1) 正常ヒト血清(SAA濃度は検出限界以下、NHSと表現した)のみ
- (2) 精製ヒトHDLのPBS溶液(SAA濃度7.5 μ g/ml)
- (3) rSAAのPBS溶液(SAA濃度7.5 μ g/ml)
- 25 (4) NHSにrSAAを添加(最終SAA濃度は7.5 μ g/ml)
- (5) NHSに血清から精製したSAAを添加(最終SAA濃度は7.5 μ g/ml)

またゲルろ過の条件は次のとおりである。カラムにはTSK gel G3000SWXL(東ソー製)を用い、20mMリン酸緩衝液(pH7.2、0.15M NaCl含有)を溶出液として流速1ml/min.で溶出し1mlずつ分画した。この

条件で f S A A は Fr. 1 3 - 1 5 (分子量 1 0 - 4 0 kD に相当) に、一方 H D L と会合した S A A は Fr. 8 - 1 0 (分子量 1 0 0 - 3 0 0 kD に相当) に溶出される。

結果は図 1 ~ 5 に示すとおりである。本発明の抗体は、f S A A に相当する 5 Fr. 1 3 - 1 5 に溶出される分画に明らかに反応性を示すが、従来法によって得られた抗体では同じ分画における反応性が確認できない (図 3 - 5)。加えて本発明の抗体は、f S A A に対する反応性のみならず、H D L - S A A に対しても従来の抗体よりも高い反応性を示している (図 4 - 5)。このような現象から、大腸菌で発現させた r S A A と f S A A は免疫学的に同一であることが確認され 10 た。また図 3 に示した r S A A を P B S に溶解したものを試料としてもものは、1 0 - 4 0 kD の分画に溶出される S A A は r S A A に他ならない。したがって公知の抗体は r S A A との間で観察可能な凝集を示さないのに対し、本発明の抗体は r S A A と反応して凝集することが明らかである。

この他、図 1 により正常血清ではいずれの抗体でも反応していないことがわか 15 る。またいずれの抗体を用いても、H D L 分画として回収した S A A と反応させた場合には 1 0 0 - 3 0 0 kD (H D L - S A A) でのみ反応性が確認された (図 2)。

5. 試薬の直線性

本発明によって得られる S A A の免疫学的測定試薬の直線性を、従来の抗体に 20 よって得られる試薬と比較した。

0 - 6 6 μ g/ml の S A A を含む希釈系列を用意し、3 で得た乳液による測定を試みた。操作は次のとおりである。希釈系列は濃度を検定した S A A 含有血清を S A A 濃度が 6 6 μ g/ml となるように 5 0 mM の H E P E S 緩衝液 (p H 7. 4、以下単に希釈液と記載する) で希釈したものをもとに、希釈液で倍々希釈して作 25 成した。希釈液 2 2 5 μ l と各濃度の S A A 含有溶液 2 0 μ l を測定セルに分注し、1 3 0 秒後に乳液 7 5 μ l を添加して波長 6 6 0 nm で散乱光を測定 (散乱光 T 2)、その 4 0 秒後に散乱光を測定 (散乱光 T 3)、ついで 1 3 0 秒後に 3 回目の散乱光測定 (散乱光 T 4) を行って各測定点の間の散乱光強度の差を求めた。測定には全自動免疫化学分析装置 L X - 3 0 0 0 (栄研化学・アナリティカ

ルインstrument製、商品名)を用い、結果はこの装置の測定値として得られるDLSEで示した(表1)。

表1. 本発明の抗体と従来の抗体による試薬の直線性の比較

SAA濃度 μg/ml	従来の抗体		本発明の抗体	
	T3-2	T4-2	T3-2	T4-2
0	53	101	16	39
0.52	87	160	37	75
1.03	123	220	57	111
2.06	185	325	98	186
4.13	337	594	203	379
8.25	666	1,198	408	759
16.5	1,191	2,153	1,002	1,879
33	1,457	2,547	2,023	3,520
66	1,249	2,114	2,803	4,374

表1のデータを基に標準曲線を描いたのが図6である。図6から明らかなように、本発明の抗体を利用した試薬では0.52~66 μg/mlまで測定値が増加し続けており、100倍以上の濃度差(具体的には約127倍)を同じ条件で測定できている。これに対して従来の抗体では33 μg/ml程度までしか直線性を保証できず、測定値が増加し続けている範囲は濃度差で60倍強である。従来の抗体による測定範囲は不十分なものではないかもしれないが、測定可能範囲が狭いために希釈を要するサンプルが発生する可能性が有る。従来抗体に対して非常に測定範囲が広い本発明の抗体によれば、測定範囲を越えるために希釈再測定しなければならないサンプルに遭遇する機会を大きく減らすことが可能である。

6. 抗体の反応性(特異性)

公知の抗体と本発明の抗体の特異性を比較するため、Multi-Pin Peptide Synthesis Starter Kit Non-Cleable Type (Chiron Mimotopes Pty.Ltd.製、商品名)を用いて10残基ずつ48種類のペプチドを合成後、従来の抗SAA抗体と本発明による抗SAA抗体をそれぞれ反応させ、反応性の違いを基にエピトープマッピング[19]を試みた。合成ペプチドのアミノ酸配列は、配列1に示すSAAのアミノ酸配列のN末端から順に2アミノ酸残基ずつずらした10残基で、96穴マイクロタイタープレートのウェルの位置に対応するように配置されたピン

の先端に固定した。これを抗体溶液を分注したウエルに浸漬することによって免疫反応を行えるようになっている。

抗体は20mMのリン酸緩衝液（pH7.2、2%のBSA、0.1%のTween 20、0.15MのNaCl含有）で2000倍希釈後、各ウエルに175μl分注して合成ペプチドを固定したピンを浸漬した。4℃にて一晩静置後PBSでピンを洗浄し、ペルオキシダーゼ（以下PODと省略する）標識抗体と反応させた。POD標識抗体は、市販のPOD標識抗ラビットIgGヤギ血清を20mMのリン酸緩衝液（1%のBSA、0.15MのNaCl含有）で2000倍希釈して用い、各ウエルに175μl分注して洗浄したピンを浸漬し室温で60分反応させた。反応後にピンをPBSで洗浄後、150μlの基質溶液（0.84mMのテトラメチルベンチジンと2mM過酸化水素を含む）を分注したウエルに浸漬し、20分後にピンを引き上げ停止液として3.6Nの硫酸を50μlずつ加えた。マイクロプレートリーダーで450nmにおける吸光度を測定した。

本発明のエピトープマッピングの結果を図7（本発明の抗体）、および図8（従来の抗体）に示す。図の横軸の数字はピンの番号を示し、1がN末端のArgから始まる10アミノ酸残基で構成される合成ペプチドで、2以下が3、5、7....と2個ずつずらした10アミノ酸残基に相当する。両者の反応パターンにはほとんど違いが無く、エピトープの選択によって結合活性の改善を説明することはできないものと推測された。

20 7. 抗体の反応性（結合活性）

本発明の結合活性を数値化するために、IAsysの固相リガンドには抗原であるrSAAを用い、液相には抗体を用いて測定した後、FASTfit解析ソフト（登録商標）によって解離平衡定数を算出した。IAsysは固相リガンド（rSAA）に対する液相中の結合成分（イムノグロブリン分子）の結合状態をリアルタイムに観察することが可能なシステムである。

カルボキシメチルデキストラン（CMD）でコートされたキュベットに、0.05%のTween20を含む10mMリン酸緩衝液（137mMのNaCl、2.7mMのKCl含有、以下PBS/Tと省略する）を200μl加え、温度が24.5℃から25.5℃に安定化するまで約10分間放置した後にベースラインを7分間測

- 定した。200 μ lの0.4MのEDC/0.1M NHSを7分間反応させ、カルボキシル基を活性化した後、未反応のEDC/NHSをPBS/T 緩衝液で洗浄除去した。予め酢酸緩衝液(10mM、pH5.0)に溶解しておいたrSAA (50 μ g/ml)をリガンド溶液として200 μ l加え10分間固相化させた。な
- 5 おEDCとは1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimideをさし、NHSとはN-Hydroxysuccinimideをさす。未反応のリガンドをPBS/Tで洗浄除去後、1Mエタノールアミン水溶液pH8.5を200 μ l加え5分間反応させることにより、未反応のカルボキシル基を不活化した。PBS/Tで洗浄した後に固定化したrSAAの総量を共鳴角として数値化した。
- 10 このキュベットに各濃度の抗体溶液を加え、リガンドであるrSAAに会合する抗体量をリアルタイムで測定した。続いて、PBSを加えて解離する抗体量をリアルタイムで測定した。測定後のキュベットは、3MのKSCN、0.2%のEDTA2Naで2分間処理して抗体を完全に解離後、PBS洗浄することにより再利用した。キュベットに加えた抗体濃度は31.25nM、62.5nM、125
- 15 nM、250nM、および312.5nMで、各濃度における結合状態からIAsysのFASTfit解析ソフト(登録商標)によって、会合速度定数 K_{ass} 、解離速度定数 K_{diss} (あるいは K_{on})を求め、更に解離平衡定数 K_D は K_{diss}/K_{ass} によって算出した。またその逆数が会合平衡定数 K_A である。使用したパラメーターは、各会合開始前の120秒間をベースラインとし、会合相(association phase)は抗体添
- 20 加後の5-180秒後まで、解離相(dissociation phase)はPBS添加後の5-120秒までとした。
- この解析の結果、従来の抗体のrSAAに対する解離平衡定数 K_D は $7.25 \pm 2.73 \times 10^{-7}$ Mであるのに対して、本発明の抗体は $1.01 \pm 0.48 \times 10^{-7}$ Mであり、両者の間には少なくとも3倍の開きがあった。すなわち本発明の抗
- 25 体は、従来の抗体に比べてrSAAに対する結合活性(avidity)が3倍以上大きいとすることができる。なお解析のためのデータの一部を図9として示した。

産業上の利用可能性

本発明の抗体によって、従来の抗体では実現の困難な広い測定範囲を持った試薬を容易に得ることができる。また本発明の抗体を利用したSAAの免疫学的測定用試薬、あるいはSAAの免疫学的測定方法によって、自動化が容易な免疫学的凝集反応に基づく測定範囲の広い分析が可能になる。本発明によって提供される新規な抗体を利用したSAAの免疫学的測定試薬は、特に高い濃度における直線性に優れ、広い測定範囲を実現するものである。

SAAは鋭敏な炎症マーカーとして有用である。炎症症状に伴って血清濃度が上昇するのはヒトの場合には 1α 、 1β 、 1γ 、 2α 、および 2β といったサブクラスである。本発明による抗体を利用すれば、これらのサブクラスを広い濃度範囲にわたって測定することができる免疫学的測定試薬の提供が可能となる。

更に、本発明の抗体はrSAAの精製に有用である。従来の抗体では精製が困難な細菌を宿主として得られたrSAAを、本発明の抗体は強い結合活性で結合し高い収率で回収することができる。

引用文献

- 15 [1] J.Clin.Invest.53:1054-1061,1974
[2] J.Clin.Invest.55:746-753,1975
[3] J.Clin.Invest.61:390-394,1978
[4] Marker Protein in Inflammation, Vol.3 p157-162,1986
20 [5] Klinische Wochenschrift 67:447-451,1989
[6] Clin.Chim.Acta,179,169-175,1989
[7] Scand.J.Immunol.,18,329-338,1983
[8] Ann.Clin.Biochem.,30,72-76,1993
[9] 生物物理化学 Vol.36,No.4,217(29)-222(34),1992
25 [10] Gene 139 73-75,1994
[11] Biochemistry 24:2931-2936,1985
[12] J.Immunol.Methods.,116,131-135;1989
[13] J.Immunol.Methods.,54,213-221,1982

[14] Ann.N.Y.Acacd.Soc.121 404,1964

[15] Ann.N.Y.Acacd.Soc.121 321,1964

[16] J.Biol.Chem.262:15790-15795,1987

5 [17] 特開平4-254760

[18] J.Immunol.Methods.83,217-225,1985

[19] SOUTHEAST ASIAN J TROP MED PUBRIC HEALTH,24(4)523,1990

配列表

10 配列番号 : 1

配列の長さ : 104

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

15 起源 : ヒト

他の情報 : ヒト血清アミロイドA

配列

Arg	Ser	Phe	Phe	Ser	Phe	Leu	Gly	Glu	Ala	Phe	Asp	Gly	Ala	Arg
1				5					10					15
20	Asp	Met	Trp	Arg	Ala	Tyr	Ser	Asp	Met	Arg	Glu	Ala	Asn	Tyr
				20					25					30
	Gly	Ser	Asp	Lys	Tyr	Phe	His	Ala	Arg	Gly	Asn	Tyr	Asp	Ala
				35					40					45
	Lys	Arg	Gly	Pro	Gly	Gly	Val	Trp	Ala	Ala	Glu	Ala	Ile	Ser
25				50					55					60
	Ala	Arg	Glu	Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Phe	Gly	His	Gly	Ala	Glu
				65					70					75
	Ser	Leu	Ala	Asp	Gln	Ala	Ala	Asn	Glu	Trp	Gly	Arg	Ser	Gly
				80					85					90

Asp Pro Asn His Phe Arg Pro Ala Gly Leu Pro Glu Lys Tyr

95

100

配列番号 : 2

5 配列の長さ : 39

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

10 他の情報 : ヒト血清アミロイドAのcDNA増幅用5'側プライマー

配列

GTAGTTCAGG TCATATGCCA AGCTTCTTTT CGTTCCTTG

39

配列番号 : 3

15 配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

20 他の情報 : ヒト血清アミロイドAのcDNA増幅用3'側プライマー

配列

GACAGGATCC GAGGAAGCTC AGTATTTCTC AG

32

25

請求の範囲

1. ヒト血清アミロイドAを認識する抗体であって、高比重リボ蛋白質とヒト血清アミロイドAとを含む血清を非変性条件下でゲルろ過により分画して得ることができる分子量10～40kDの分画に含まれるヒト血清アミロイドAに反応する抗体
2. 分子量10～40kDの分画に含まれるヒト血清アミロイドAが、次の群から選択される請求の範囲1の抗体
 - (1)ヒト血清アミロイドAを豊富に含む血清のゲルろ過による分子量10～40kDの分画から精製したヒト血清アミロイドA
- 10 (2)配列1に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子を微生物細胞を宿主として発現させて得られる組み換え蛋白質
3. 抗体の解離平衡定数が、配列1に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子を微生物細胞を宿主として発現させて得られる組み換え蛋白質を抗原として反応させた時に 2×10^{-7} M以下である請求の範囲2の抗体
- 15 4. 抗体が、更に高比重リボ蛋白質とヒト血清アミロイドAとを含む血清を非変性条件下でゲルろ過により分画して得ることができる分子量100～300kDの分画に含まれるヒト血清アミロイドAに反応する請求の範囲1の抗体
5. 請求の範囲1、または2のいずれかに記載した抗体を含むヒト血清アミロイドAの免疫学的測定試薬
- 20 6. 抗体が不溶性担体粒子に結合されたものである請求の範囲5のヒト血清アミロイドAの測定用試薬
7. 抗体が遊離の状態で存在し、かつ免疫学的な反応の場に免疫複合体形成に基づく不溶性沈降物の生成を促進する反応増強剤を供給する試薬と組み合わせられている請求の範囲5のヒト血清アミロイドAの測定用試薬
- 25 8. 抗体によってヒト血清アミロイドAを免疫学的に測定する方法であって、前記抗体が不溶性担体粒子に結合されており、この不溶性担体粒子の免疫学的凝集反応の測定値が、100倍の濃度範囲においてヒト血清アミロイドAの濃度値と1:1に対応しているヒト血清アミロイドAの測定方法

9. 請求の範囲1または2のいずれかに記載した抗体を利用するヒト血清アミロイドAの免疫学的測定方法
10. 抗体を不溶性担体粒子に固定して用いる請求の範囲9のヒト血清アミロイドAの免疫学的測定方法
- 5 11. 不溶性担体粒子の免疫学的反応による凝集を光学測定する請求の範囲10のヒト血清アミロイドAの免疫学的測定方法
12. 抗体を遊離の状態で行い、免疫複合体形成に基づく不溶性沈降物の生成を促進する反応増強剤の存在下でヒト血清アミロイドAと反応させ、生成する不溶性沈降物を光学測定する請求の範囲9のヒト血清アミロイドAの免疫学的測定
- 10 方法
13. ヒト血清アミロイドAを抗体と結合させ共存成分と分離した後に抗体と結合したヒト血清アミロイドAを回収するヒト血清アミロイドAの精製方法であって、抗体として請求の範囲1または2のいずれかに記載したものをを用いる方法
- 15 14. 精製すべき血清アミロイドAが、以下に示す1または2から選択されるゲルろ過による分子量10～40kDの分画に含まれるものである請求の範囲13の精製方法
- (1)血清中に存在し高比重リボ蛋白質分画以外に含まれるヒト血清アミロイドA
- (2)ヒト血清アミロイドAに特異的な抗原決定基を少なくとも1つ備えており、
- 20 かつ配列1に示すアミノ酸配列、またはその部分配列をコードする遺伝子から発現させて得られる組み換え蛋白質
15. 免疫学的凝集反応のためのヒト血清アミロイドAを認識する抗体であって、高比重リボ蛋白質とヒト血清アミロイドAとを含む血清を非変性条件下でゲルろ過により分画して得ることができる分子量10～40kDの分画に含まれるヒ
- 25 ト血清アミロイドAに反応する免疫学的凝集反応用抗体
16. 免疫学的凝集反応が、免疫学的ラテックス凝集法である請求の範囲15の抗体

図 1

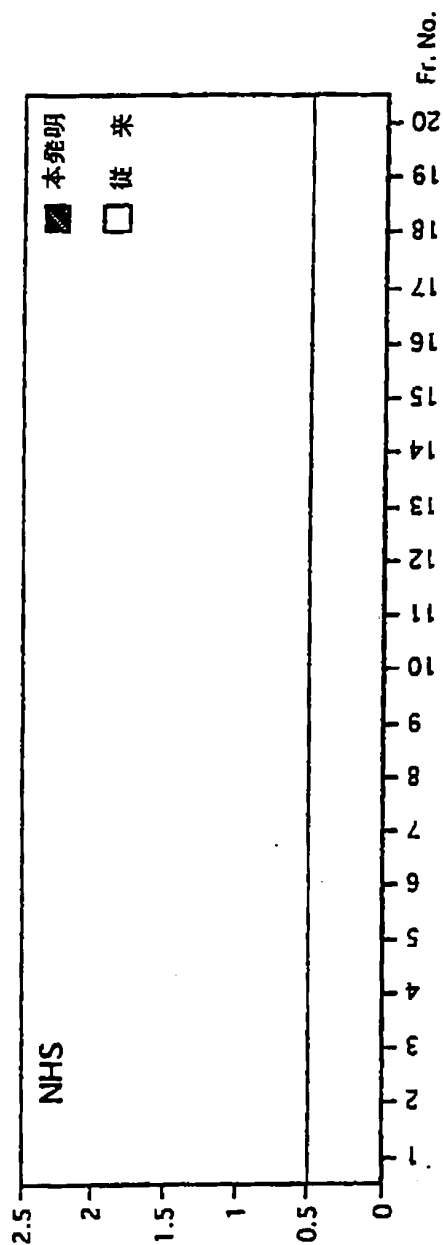


図 2

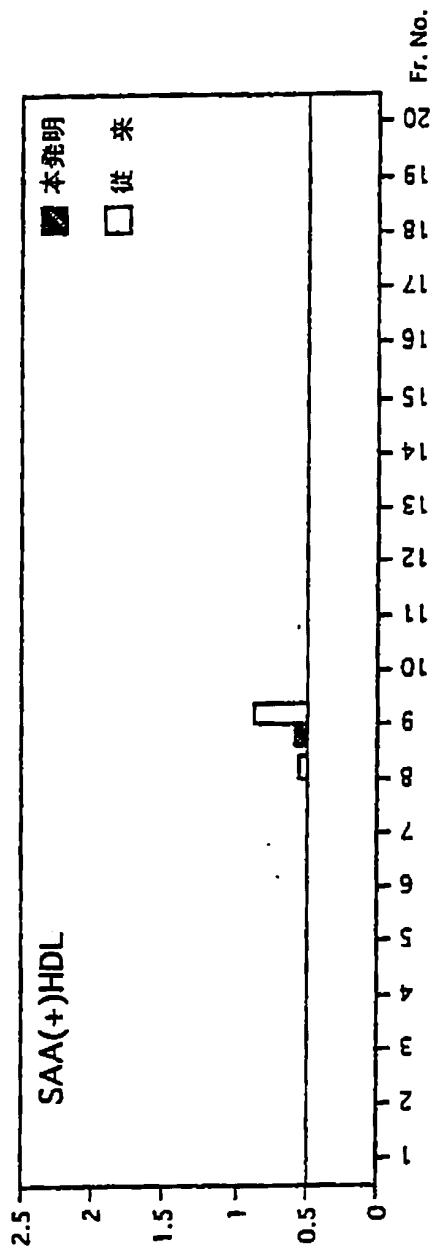


図 3

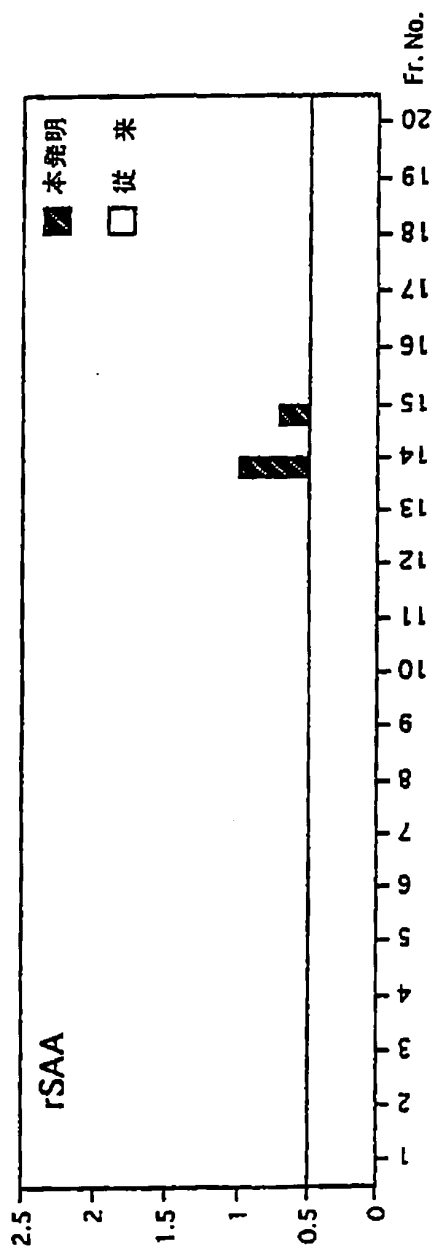


図 4

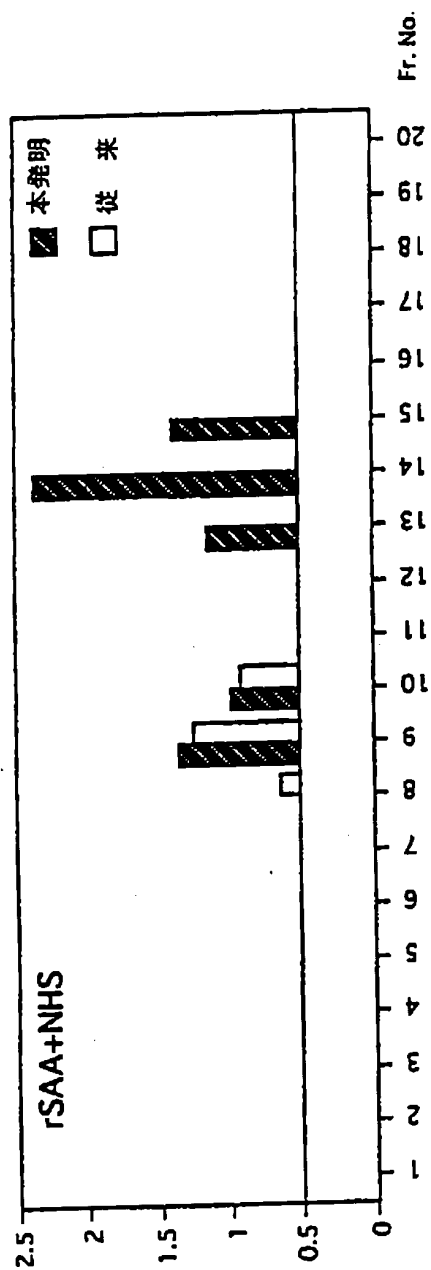


図 5

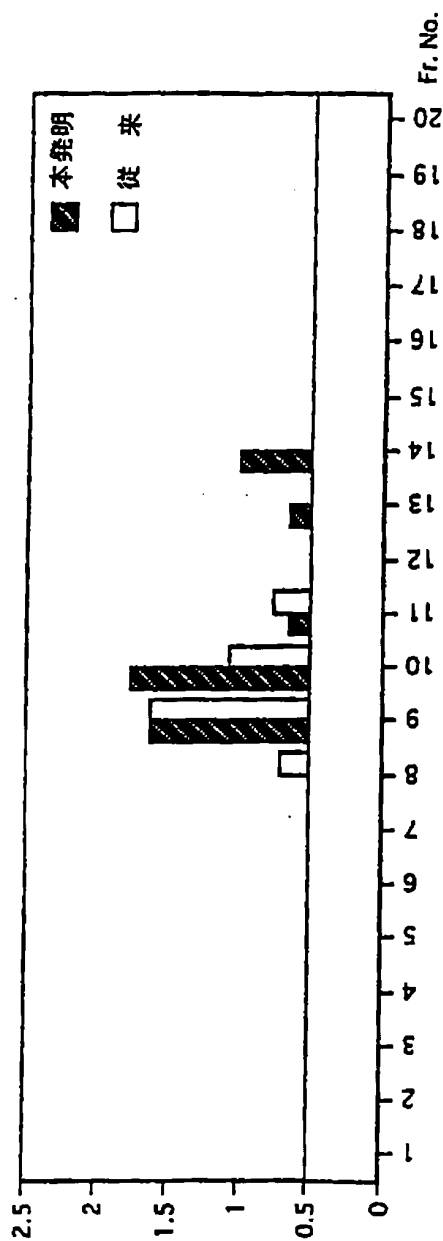


図 6

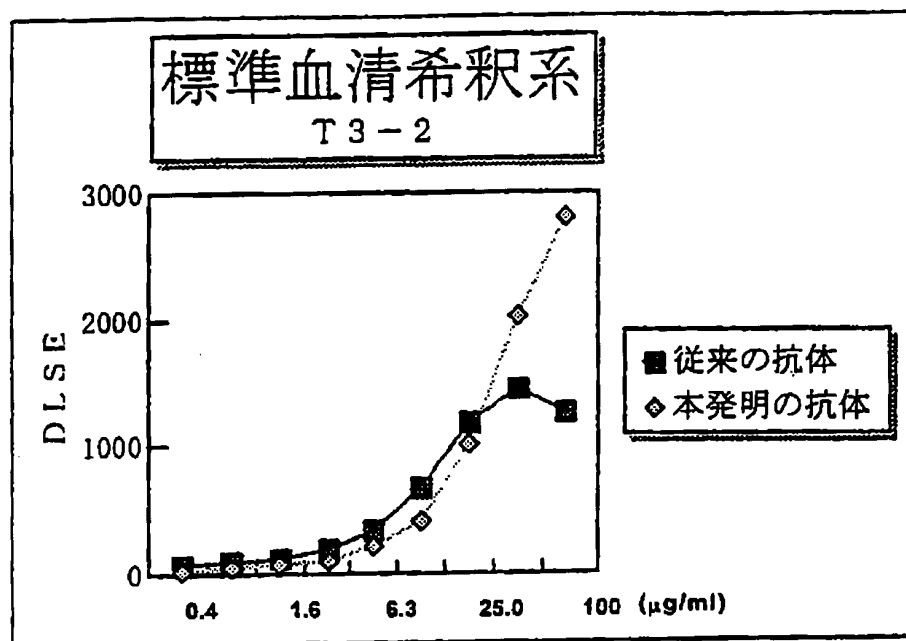


図 7

本発明による抗体

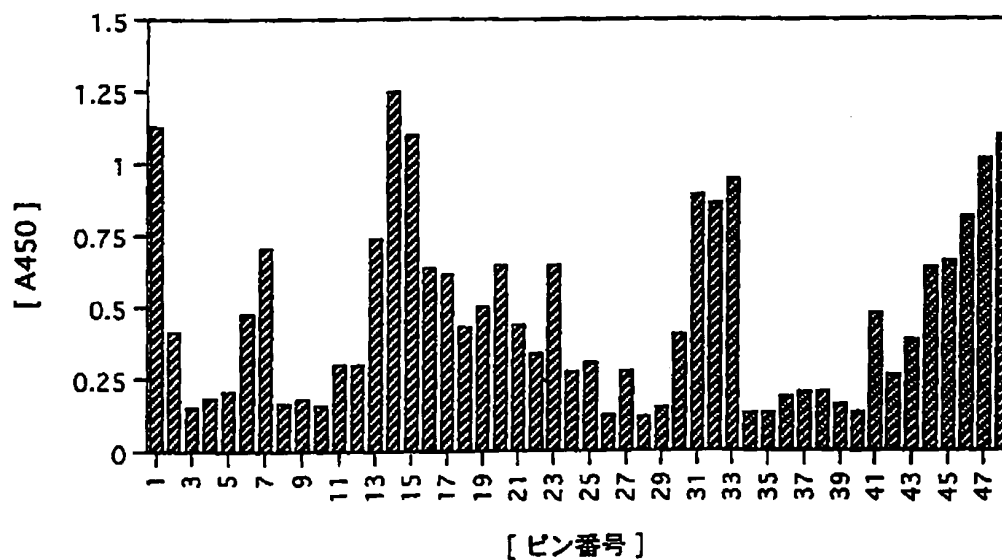


図 8
従来の抗体

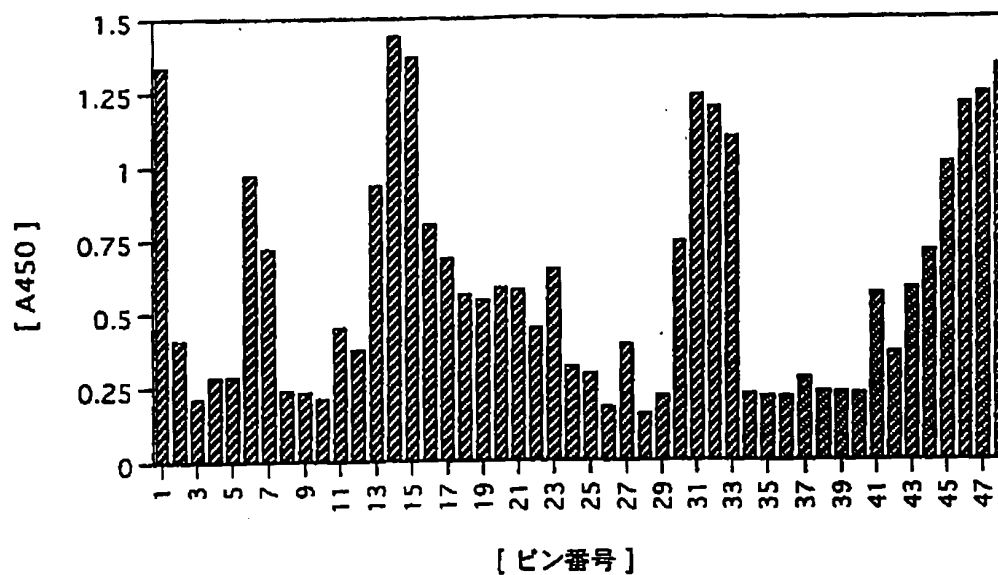
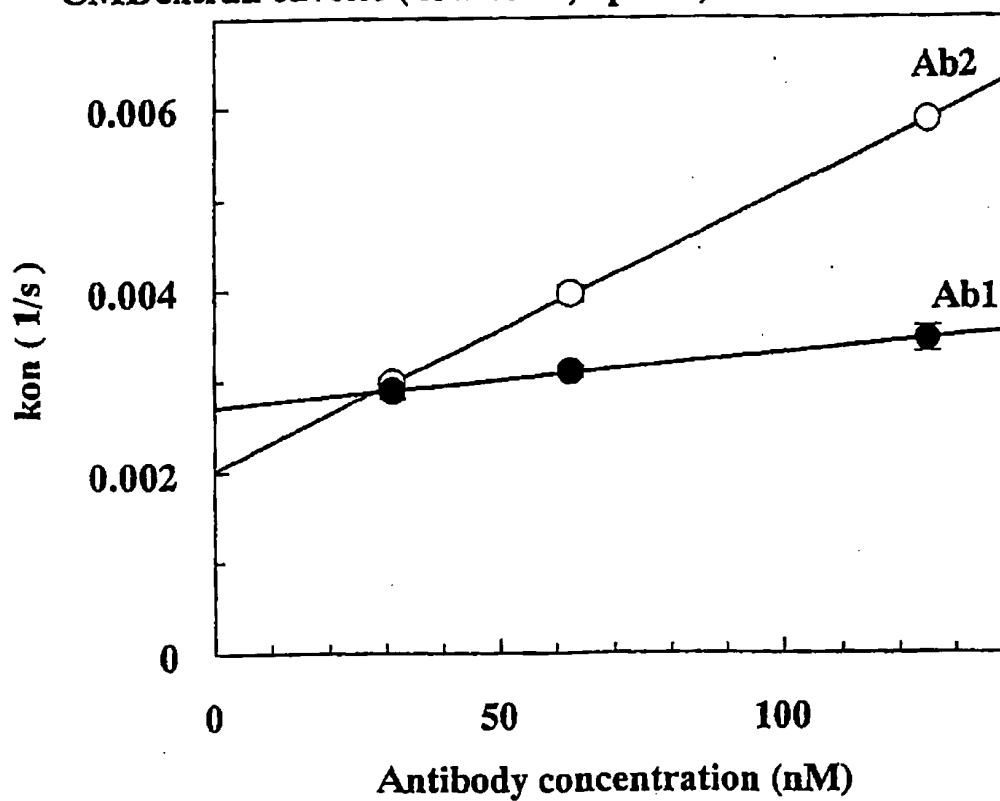


図 9

FASTfit Analysis between Ab1 or Ab2 and Ag3 immobilized
CMDextran cuvette (low conc , 3point)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02219

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07K16/18, G01N33/53, G01N33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07K16/18, G01N33/53, G01N33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Biophysical Chemistry, Vol. 36, No. 4, 1992 Hiromi Nagatoku and two others "Study (1st report) on Serum amyloid A(SAA)" p. 29-34	1-4, 13, 14
X	Biophysical Chemistry, Vol. 37, No. 1, 1993 Hiromi Nagatoku and four others "Study (2nd report) on Serum amyloid A(SAA)" p. 19-23	5-12, 15, 16
X	Biochemical Journal, Vol. 263, (1989) Alistair F. STRACHAN et al. "Human Serum amyloid A Protein", p. 365-370	1 - 4
X	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 89, (1992) L. Meek et al. "Murine Serum amyloid A ₃ is a high density apolipoprotein and is secreted by macrophages" p. 7949-7952	1 - 4
A	JP, 61-191697, A (Gambro Lundia A.B.), August 26, 1986 (26. 08. 86) & EP, 191349, A2 & US, 4755380, A	1 - 16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
October 30, 1996 (30. 10. 96)

Date of mailing of the international search report
November 12, 1996 (12. 11. 96)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office
Facsimile No.

Authorized officer
Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C07K16/18, G01N33/53, G01N33/577

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C07K16/18, G01N33/53, G01N33/577

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	生物物理化学, 第36巻, 第4号, 1992 永徳広美 外二名「Serum amyloid A (SAA) に関する研究 (第1報)」p.29-34	1-4, 13, 14
X	生物物理化学, 第37巻, 第1号, 1993 永徳広美 外四名「Serum amyloid A (SAA) に関する研究 (第2報)」p.19-23	5-12, 15, 16
X	Biochemical Journal, 第263巻, (1989) Alistair F.STRACHAN et al. 「Human Serum amyloid A Protein」.p.365-370	1-4
X	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第89巻, (1992) L.Meek et al. 「Murine Serum amyloid A, is a high density apolipoprotein and is secreted by macrophages」p.7949-7952	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.10.96

国際調査報告の発送日

12.11.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

今村 玲英子

4H

8517

電話番号 03-3581-1101 内線3444

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 61-191697, A (ガムフロ ルンディア アクチーボラグ) 26. 8 月. 1986 (26. 08. 86) &EP, 191349, A2&US, 4755380, A	1-16

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.